

3. Галоян А. А. Вопросы биохимии мозга, 13, 9—38, Ереван, 1978.
4. Галоян А. А. ДАН АрмССР, 64, 2, 116—121, 1977.
5. Авакян О. М. Фармакологические регуляция высвобождения и захвата норадреналина, Ереван, 1973.
6. Турпаев Т. М. Меднаторная функция ацетилхолина и природа холинорецепторов М., 1962.
7. Минухин Б. Н. Физиология адренорецепторов. М., 1968.
8. Галоян А. А. Патент № 403214 с приоритетом от 2 января 1968.
9. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Сарибекян Г. А., ДАН АрмССР, 67, 3, 176—179, 1978.
10. Путинцева Т. Г., Карапетян Р. О. ДАН АрмССР, 69, 2, 119—124, 1979.
11. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Логосян М. А. Вопросы биохимии мозга, 11, 89—96, Ереван, 1976.
12. Галоян А. А., Чифликян М. Д., Мурадян М. Ш., Едигарян А. К., Абрамян С. С. Нейрохимия, 5, 1, 45—48, 1986.
13. Birmingham A. T., Wilson A. B. Br. J. Pharmacol. Chemother., 11, 3, 369—580, 1967.
14. Swedin C. Acta Physiol. scand. suppl. 1, 369—375, 1971.

Поступило 6.V 1988 г.

Биолог. ж. Армении, № 2, (42), 1989

УДК 577.15.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИИ АКТИВНОСТИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ КАРДИОАКТИВНЫХ НЕЙРОГОРМОНОВ «К» И «С»

К. А. ГАЛОЯН, М. А. ДАВТЯН, Р. М. СРАПИОНЯН

Институт биохимии АН АрмССР, Ереванский государственный университет

Выявлен неконкурентный тип ингибирования аргиназы нейрого르몬ами «К» и «С», что свидетельствует о связывании их с аргиназой не в каталитическом центре. Опыты по десенситилизации аргиназы при помощи тепловой обработки выявили аллостерический механизм взаимодействия с нейрого르몬ами.

Բացակայում է «К» և «С» նեյրոհորմոնների արգինազայի ներմտն ու արգինազայի կենտրոնի հետ կապված կատալիտիկ ծախսի ու կատալիտիկ կենտրոնում ձևավորված արգինազայի դեզսենսիտիզացիայի փորձերը ցուցաբերում են նեյրոհորմոնների հետ փոխազդեցության ալոստերիկ ձևակերպը:

Incompetitive type of arginase inhibition by neurohormones «K» and «C» is revealed, which indicates their connection with arginase not in the catalytic centre. Experiments on arginase desensibilization with the help of thermal treatment show the allosteric mechanism of interaction with neurohormones.

Аргиназа—нейрого르몬ы «К» и «С»—аллостеризм.

Целью данного исследования является изучение влияния нейрого르몬ов «К» и «С» на активность коммерческой лиофилизированной арги-

Сокращения: ДЭАЭ—целлюлоза—диэтиламиноэтил—целлюлоза, ФДЭ—фосфодистетераза, ЭПФ—электронноларамагнитный резонанс.

пазы, выделенной из печени крупного рогатого скота, а также на активность I и II изоэнзимов частично очищенной аргиназы печени крыс. Эти нейрогормоны путем возможного воздействия на активность аргиназ различной природы и их изоферментов могут оказать регулирующее влияние на ряд важных метаболических процессов.

Материал и методы. Кардиоактивные нейрогормоны «К» и «С» выделяли двумя способами: из плазматических соединений гипоталамуса и висцеролизированном из своих белковых носителей методом диализа против 0,1 N CH_3COOH .

Гель-фильтрацию низкомолекулярных соединений проводили на колонке с модифицированным и ионообменным сорбентом G-10. Гликозилирование сыворотки влило по методу Крейга и соавт. с некоторыми модификациями [2, 5].

Ионообменную хроматографию проводили на колонках, заполненных ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной 0,005 M натрий-фосфатным буфером (рН 6,5). Применяли линейную градиентную элюцию по соответствующей схеме. Значительный градиент концентрации соли (0,02—0,5 M) сочетался с небольшим понижением рН буфера, от 6,5 до 5,0. Скорость элюции составляла 20 мл/час.

Нисходящую хроматографию на бумаге FN-11 осуществляли в системе растворителей бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5).

Активность ФДЭ цАМФ мозга крыс определяли по количеству гидролизованного субстрата при его инкубации с ферментом по методу [8], модифицивавшему применением радиоактивного микрометода, предусматривающего разделение продуктов гидролиза с помощью восходящей тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол-254» [1]. В качестве источника ФДЭ цАМФ использовали супернатант гомогената (2000 \times g, 20 мин) мозга крыс. Счет радиоактивности продуктов гидролиза цАМФ проводили на сцинтилляционной спектрометре.

За единицу активности НК принимали активность препарата, ингибирующего 1 мЕ ФДЭ супернатанта гомогената (2000 \times g, 10 мин) мозга крыс в минуту в процессе инкубации при 37° и рН 3,6. Препараты НК, как и НС, дозированы в единицах биологической активности. За единицу биологической активности принимали количество препарата, увеличивающее объемную емкость крови, оттекающей из венечных сосудов сердца на 100% по сравнению с нормой. Выделение и очистку изоферментов аргиназы производили по методу [3]. Блок определяли по Лоури и модификации [7]. Константу ингибирования определяли по Джексону [6], аргиназную активность—методом [9], мочевику—по методу Арчиальда [4] с использованием набора реактивов для стандартных исследований биологических жидкостей («Лакма», СССР).

Результаты и обсуждение. Коммерческая лиофилированная аргиназа, выделенная из печени крупного рогатого скота («Реанал»), состоит из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 71000 Д. Исследования показали, что нейрогормон «С» по сравнению с нейрогормоном «К» оказывает ингибирующее влияние на активность аргиназы печени крупного рогатого скота в значительно меньших концентрациях: 70 мЕ (0,021 ед. биол. акт. нейрогормона «С») подавляют активность аргиназы на 18%, а 228 мЕ (0,063 ед. биол. акт. нейрогормона «С») почти не оказывают ингибирующего воздействия, 0,06 ед. биол. акт. нейрогормона «К» ингибируют активность аргиназы на 24%, а 0,24 ед. биол. акт.—на 15%. Эти данные также свидетельствуют о возможном непосредственном влиянии нейрогормонов на активность аргиназы печени крупного рогатого скота. Для выяснения типа ингибирования мы использовали известный метод Диксона для определения ингибиторных констант. При этом константу ингибирования K_i мы не определяли, так как пока мы не можем выразить концентрацию нейрогормонов в весовых количествах. Результаты исследований, пред-

ставленных на рис. 1, показали, что исследованные нейрого르몬ы неадкурентно ингибируют активность аргиназы.

Результаты экспериментов в условиях *in vivo* и *in vitro* по изучению влияния нейрого르몬ов «К» и «С» на активность аргиназы привели к необходимости изучения влияния указанных нейрого르몬ов на I и II изоэнзимы аргиназы печени крыс, тем более что, очевидно, I изоэнзим является уреотелическим, а II изоэнзим неуреотелическим.

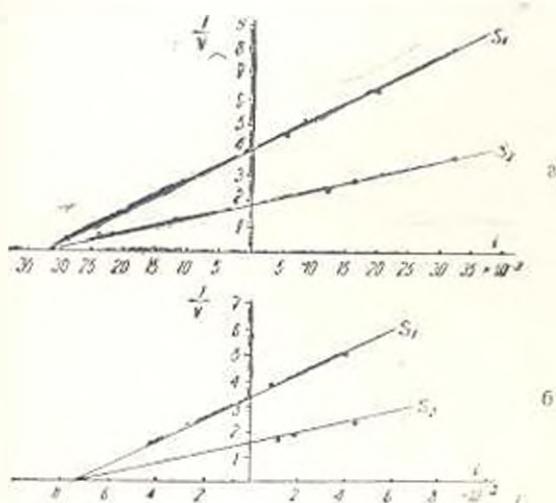


Рис. 1. Ингибирование аргиназы печени крупного рогатого скота: а) под воздействием нейрого르몬а «К»; б) под воздействием нейрого르몬а «С». $1/v$ — величина, обратная скорости реакции, $1/S$ — концентрация ингибитора, в ед. биол. акт.

Выделение и очистку изоферментов аргиназы печени крыс осуществляли способом [3]. В результате были получены два изоэнзима, I и II со степенью очистки 438 и 235 соответственно и выходом 63% для I изоэнзима и 15% для II. Эксперименты показали, что активность I изоэнзима аргиназы печени крыс при действии 76 мЕ/0,021 ед. биол. акт. нейрого르몬а «С» подавляется на 30%, а 228 мЕ/0,063 единиц биологической активности нейрого르몬а «С» — на 19%, второй, неуреотелический изоэнзим при воздействии той же концентрации нейрого르몬а «С» не подавляется, а 228 мЕ нейрого르몬а «К» снижает активность всего на 12%. Отметим, что 0,06 ед. биол. акт. нейрого르몬а «К» ингибирует: I изоэнзим на 18%, II — на 17%. 0,021 ед. биол. акт. нейрого르몬а «К» ингибируют I изоэнзим на 18%, а II — на 22%. Из таблиц явствует, что нейрого르몬 «К» ингибирует активность как уреотелической, так и неуреотелической аргиназы, а нейрого르몬 «С» оказывает свое воздействие на I изоэнзим, в то время как II изоэнзим, имеющий неуреотелическую природу, почти не поддается ингибирующему влиянию этого нейрого르몬а. Необходимо еще раз отметить, что нейрого르몬 «С» оказывает подавляющее влияние в более низких концентрациях, нежели нейрого르몬 «К». При исследовании типа ингибирования графическим методом Диксона, как это наглядно показано на рис. 2, активность аргиназы печени крыс подавлялась исследованными нейро-

гормонами неконкурентным механизмом. Нейрогормоны не конкурируют с субстратом за связывание в каталитическом центре, следовательно, надо полагать, они связываются в другом, регуляторном центре.

В следующей серии экспериментов нами были проведены опыты с целью выявления возможного аллостерического характера ингибирования активности аргиназы. Для этого использовали коммерческий препарат аргиназы печени крупного рогатого скота. В первую очередь исследовали зависимость активности фермента от концентрации фер-

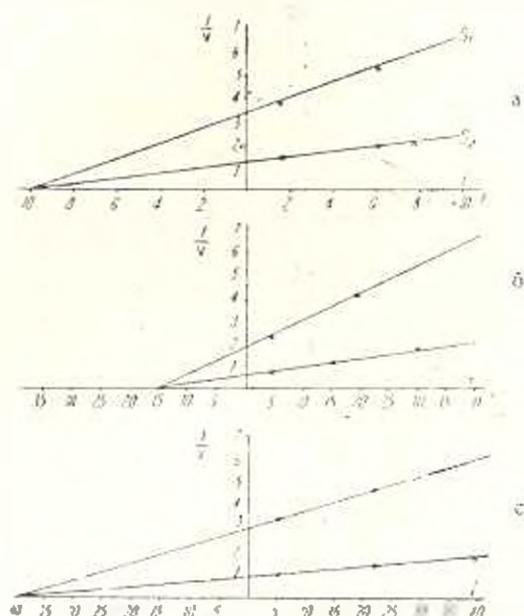


Рис. 2. Ингибирование активности I изоэнзима частично очищенной аргиназы печени крысы: а) под воздействием нейрогормона «С», б) под воздействием нейрогормона «К»; в) ингибирование активности II изоэнзима частично очищенной аргиназы печени крысы под воздействием нейрогормона «К»; $1/v$ — величина, обратная скорости реакции; i — концентрация ингибитора, в ед. биол. акт.

ментного белка. Оказалось, что зависимость выражается прямой линией. Гиперболической кривой выражается зависимость активности фермента от концентрации субстрата. Выявить зависимость, выраженную в виде характерной для аллостерических ферментов сигмовидной кривой, не удалось.

Выяснилось также, что каталитические свойства аргиназы исчезают при 10-минутной тепловой обработке при 70° . Нам нужно было найти ту температуру, при которой фермент, теряя свои регуляторные свойства, т. е. способность подвергаться воздействию модулятора (в нашем случае ингибироваться нейрогормонами), сохранял бы каталитические свойства. Оказалось, что при 10-минутной прединкубации фермента при 55° активность сохраняется полностью (контроль прединкубируется при 37° в течение 10 мин), но ферменты при этом теряют способность ингибироваться нейрогормонами «К» и «С». Мы получили данные, согласно которым 76 мЕ нейрогормона «С» ингибируют

активность аргиназы, подвергнутой тепловой обработке при 37° в течение 10 мин, на 18%, а 0,06 ед. биол. акт. нейрого르몬а «К» в аналогичных условиях—на 24%, однако после тепловой обработки фермента при 55° (10 мин) подавляющий эффект нейрого르몬ов не проявляется. Таким образом, нам удалось при помощи тепловой обработки десенситивизировать аргиназу в отношении отрицательного модулятора, что является прямым доказательством аллостерического механизма ингибирования активности этого фермента исследованными нейрого르몬ами. Следовательно, тепловая обработка фермента при 55° вызывает конформационные изменения модуляторных свойств, сохраняя конформацию каталитического центра. Для более детального изучения этого вопроса в другой серии экспериментов мы изучали ЭПР спектр аргиназы крупного рогатого скота и влияние на ЭПР спектры нейрого르몬ов. Под влиянием нейрого르몬ов «К» и «С» ЭПР спектр аргиназы печени крупного рогатого скота не меняется, не меняется также лигандное окружение марганца. Учитывая этот факт, а также то обстоятельство, что марганец является кофактором аргиназы, можно заключить, что указанные нейрого르몬ы связываются не с каталитическим центром. А это еще раз говорит в пользу аллостерического механизма взаимодействия аргиназы с нейрого르몬ами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бриташвили Д. Р., Кафиани А. А. *Вопр мед химии*, **3**, 21, 322—324, 1975.
2. Галоян Л. А., Срапцоян Р. М., Карапетян Р. О., Сиакян С. А., Саридекян Г. А. *ДАН АрмССР*, **67**, 3, 176—179, 1978.
3. Давтян М. А., Алчуджян М. Ф. *Биология Межвуз сб науч тр.*, **1**, 94—99, 1979.
4. Archibald R. M. *J. Biol. Chem.*, **156**, 1, 121—142, 1944.
5. Chen M., Creig S., Stoner J. *Biochemistry*, **19**, 11, 3559—3563, 1972.
6. Dixon M. *Biochem. J.*, **53**, 170—171, 1953.
7. Hess H. H., Lewin E. J. *Neurochem.*, **12**, 3, 205—211, 1965.
8. Poch G., Kukovetz W. *Life Sciences*, **10**, 133—137, 1971.
9. Ratner S., Pappas A. *J. Biol. Chem.*, **156**, 1, 121—142, 1944.

Поступило 18 V 1988 г.

Биолог. ж. Армении. № 2, (42), 1989

УДК 577.391:591.111

ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ОБЛУЧЕНИИ И ТЕРМИЧЕСКОМ ОЖОГЕ

М. Г. АМАДЯН, Э. С. ДИАРЯН

НИИ медицинской радиологии МЗ АрмССР, лаборатория радиационной биохимии, Ереван

Установлено, что уровень фонального, ферментативного и неферментативного ПОЛ через 5 мин после облучения и термического ожога увеличивается в различных отделах головного мозга крше. Через час и далее наблюда-

Сокращения: ПОЛ—перекисное окисление липидов; НЗП—ферментативная НАДФН-зависимая система ПОЛ; АЗП—неферментативная аскорбатзависимая система ПОЛ; МДА—малоновый диальдегид